

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



542471

(43) Date de la publication internationale
12 août 2004 (12.08.2004)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2004/067745 A1

(51) Classification internationale des brevets⁷ : C12N 15/62

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2004/000073

(22) Date de dépôt international :
15 janvier 2004 (15.01.2004)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
03/00422 15 janvier 2003 (15.01.2003) FR

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) : MILLE-
GEN [FR/FR]; Rue Pierre et Marie Curie, F-31670 Labège
(FR).

(71) Déposants (pour US seulement) : INSERM [FR/FR];
101, rue de Tolbiac, F-75654 Paris Cedex 13 (FR). UNI-
VERSITÉ PAUL SABATIER [FR/FR]; 118, route de
Narbonne, F-31062 Toulouse (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : BOUTON-
NET, Christel [FR/FR]; 2, rue de la Piscine, F-81000
Albi (FR). VAGNER, Stephan [FR/FR]; Lieu-dit Les
Tailladettes, F-31810 Clermont Le Fort (FR). FAYE,
Jean-Charles [FR/FR]; La Merre, F-31310 Mon-
tesquieu-Volvestre (FR). FAVRE, Gilles [FR/FR]; 61bis,
chemin de Villenouvelle, F-31270 Cugnaux (FR). KHAR-
RAT, Abdelhakim [FR/FR]; 69, chemin AI Cers, F-31450
Montgiscard (FR). BOUAYADI, Khalil [MA/FR]; 10,
allées Philippe Aries, F-31400 Toulouse (FR).

(74) Mandataires : VERCAEMER, Laurence. etc.; Cabinet
Plasseraud, 65/67, rue de la Victoire, F-75440 Paris Cedex
9 (FR).

(81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de
protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO,
CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB,
GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG,
KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG,
MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH,
PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN,
TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de
protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasien
(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), européen (AT,
BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR,
HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE,
SN, TD, TG).

Déclaration en vertu de la règle 4.17 :

— relative à la qualité d'inventeur (règle 4.17.iv)) pour US
seulement

Publiée :

— avec rapport de recherche internationale
— avant l'expiration du délai prévu pour la modification des
revendications, sera republiée si des modifications sont re-
çues

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrégia-
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de
la Gazette du PCT.

(54) Title: GENE EXPRESSION INDUCING FUSION PROTEIN AND METHOD FOR CONTROLLING GENE EXPRESSION
INDUCTION

(54) Titre : PROTEINE DE FUSION INDUCTRICE DE L'EXPRESSION D'UN GENE ET PROCEDE DE CONTROLE DE L'IN-
DUCTION DE L'EXPRESSION D'UN GENE

(57) Abstract: The invention relates to a gene expression inducing fusion protein comprising a) a ribonucleic acid linking peptide domain and a post-transcriptional gene expression activator domain and b) a domain enabling cytoplasmic membrane delocalization. The invention also relates to a modulatable permanent external method for controlling gene expression induction by modulating the state of post-translational modulation of the gene expression inducing fusion protein for the expression of said gene.

(57) Abrégé : L'invention a pour objet une protéine de fusion inductrice de l'expression d'un gène comprenant, d'une part, un domaine peptidique de liaison aux acides ribonucléiques et un domaine activateur de l'expression post-transcriptionnelle du gène, et, d'autre part, un domaine permettant une délocalisation à la membrane cytoplasmique. L'invention a également pour objet un procédé de contrôle externe permanent et modulable de l'induction de l'expression d'un gène par modulation de l'état de modification post-traductionnelle de la protéine de fusion inductrice de l'expression dudit gène.

WO 2004/067745 A1

PROTEINE DE FUSION INDUCTRICE DE L'EXPRESSION D'UN GENE
ET PROCEDE DE CONTROLE DE L'INDUCTION DE L'EXPRESSION
D'UN GENE

5 L'invention a pour objet un procédé de contrôle de l'induction de l'expression post-transcriptionnelle d'un gène, et en particulier un procédé de contrôle de l'induction de la traduction d'un gène.

Dans le domaine du traitement de maladies
10 héréditaires ou génétiques, des traitements de type thérapie génique, permettant de remplacer ou corriger des gènes défectueux sont en cours de développement. La thérapie génique peut également avoir des applications importantes dans la délivrance de protéines, telles que
15 par exemple des cytokines, des anti-oncogènes, des hormones ou des anticorps, lesdites protéines ayant une activité thérapeutique dans le traitement de pathologies de type cancer ou infections virales.

Cependant, même si l'on peut induire l'expression
20 d'un gène, donc de la protéine codée par le gène, l'absence de moyens de contrôle de l'expression de cette protéine est une barrière à l'utilisation de telles techniques, en particulier dans le cadre d'une thérapie génique. Un moyen simple et sûr de contrôle de
25 l'induction de l'expression d'un gène, et donc de la protéine qu'il code, trouverait des applications aussi bien dans des protocoles de thérapie génique, que dans l'établissement de lignées cellulaires exprimant un transgène ou encore dans l'obtention d'animaux
30 transgéniques.

On connaît déjà des moyens d'induction de l'expression d'un gène.

Cependant, la plupart des moyens décrits sont basés sur des inductions transcriptionnelles et présentent des inconvénients majeurs pour une utilisation en thérapie génique. On citera en particulier l'article de Mills (2001) *Changing colors in mice: an inducible system that delivers*, GENES & DEVELOPMENT, 15:1461-1467. Les protéines chimères activatrices de ces différents systèmes de l'art antérieur provoquent des réactions immunogéniques et/ou les inducteurs pharmacologiques utilisés (tétracycline, rapamycine) entraînent des réactions cellulaires et tissulaires non souhaitées.

On citera également le document GB 2 273 708, qui décrit principalement un procédé de criblage de composés modulant l'association protéine/membrane cellulaire, ledit procédé utilisant une protéine hétérologue incluant une séquence de reconnaissance pour l'adhésion à la membrane cellulaire et un activateur transcriptionnel. L'ensemble de la description fait référence à l'activation de la transcription. Par ailleurs, il est fait référence aux possibilités d'activation ou induction (« switch on ») d'un gène grâce à la protéine de fusion, mais le contrôle en tant que tel, c'est-à-dire la maîtrise, de l'expression n'est jamais discuté ni suggéré.

La demande de brevet WO 99/11801 décrit également l'activation de la transcription d'un gène, en utilisant un facteur de transcription libéré de la membrane cellulaire par une protéase. Le mode d'action est ici un clivage protéolytique. De plus, c'est de nouveau l'activation qui est recherchée et discutée, et non un contrôle de l'expression du gène.

Par ailleurs, la demande de brevet WO 00/53779 décrit un procédé d'induction traductionnelle de l'expression d'un gène, utilisant une protéine de recrutement des ribosomes, c'est-à-dire une protéine analogue à eIF4G ou un dérivé ou fragment traductionnellement actif de celle-ci. Cette protéine est fusionnée avec une protéine ou un fragment ou dérivé de protéine, capable de se fixer sur un site de fixation de protéine hétérologue ou HBS (« heterologous protein-binding site ») présent sur l'ARNm. Un exemple de protéine se fixant à l'ARNm est l'IRP-1. Un exemple d'HBS est l'IRE (« Iron Responsive Element »). La protéine de fusion obtenue peut se fixer sur un HBS, et joue le rôle d'un activateur de la traduction de l'ARNm donc de l'expression de la ou des protéines codées par cet ARNm en aval de l'HBS.

Ce document explique également que l'expression de la ou des protéines peut être contrôlée. Ce contrôle est effectué par l'utilisation de différents HBS sur l'ARNm. Il s'agit donc d'un contrôle a priori, exercé au début du traitement ou de l'expérience, plutôt que d'une réelle maîtrise de l'induction. Une fois le nombre et la nature des HBS choisis, l'induction de la traduction n'est plus modulable.

Par conséquent, il existe encore un réel besoin d'un moyen de contrôle modulable de l'induction de l'expression post-transcriptionnelle d'un gène, contrôle qui doit pouvoir s'exercer à tout moment au cours de la mise en œuvre de l'induction de l'expression post-transcriptionnelle, aussi bien qualitativement que quantitativement.

La présente invention a donc pour objet un procédé de contrôle externe, permanent et modulable de

l'induction de l'expression post-transcriptionnelle d'un gène, ledit contrôle permettant de déclencher, d'arrêter et de moduler l'induction à tout moment. Par induction de l'expression post-transcriptionnelle, on entend l'induction de toute étape post-transcriptionnelle de l'expression d'un gène, c'est-à-dire notamment la traduction, l'épissage des pré-ARNm, la polyadénylation des pré-ARNm, etc., et en particulier la traduction.

10 Dans le cadre de l'invention, l'induction de l'expression post-transcriptionnelle d'un gène est mise en œuvre par l'expression d'une protéine de fusion spécifique, appelée protéine de fusion inductrice.

La protéine de fusion inductrice mise en œuvre pour induire l'expression post-transcriptionnelle d'un gène selon l'invention comprend d'une part un domaine peptidique de liaison aux acides ribonucléiques et un domaine activateur de l'expression dudit gène, et, d'autre part, un domaine permettant une délocalisation à la membrane cellulaire.

Toute protéine ou polypeptide connu de l'homme du métier pour induire l'expression d'un gène peut être utilisé comme protéine de fusion inductrice selon l'invention, soit en tant que tel(le) s'il(elle) comprend un domaine permettant une délocalisation vers les membranes en plus du domaine activateur de l'expression du gène, soit en tant que protéine ou polypeptide de fusion en association avec un domaine permettant une délocalisation vers les membranes. En particulier, toute protéine de fusion connue de l'homme du métier pour induire la traduction peut être utilisée, et notamment celles décrites dans la demande de brevet WO00/53779 mentionnée précédemment, à savoir

toute protéine de fusion entre une protéine analogue à eIF4G ou à un dérivé ou fragment traductionnellement actif de celle-ci, fusionnée avec une protéine ou un fragment ou dérivé de protéine se fixant à l'ARNm. On
5 citera à titre non exhaustif la protéine de fusion entre eIF-4G1 et IRP-1.

La protéine de fusion inductrice selon l'invention comprend donc un domaine permettant une délocalisation membranaire. Ce domaine est présent
10 intrinsèquement ou est fusionné avec un domaine peptidique de liaison aux acides ribonucléiques et un domaine activateur de l'expression.

Un domaine permettant une délocalisation membranaire est un domaine peptidique qui est le site
15 d'une modification post-traductionnelle de la protéine permettant la délocalisation aux membranes cellulaires (cytoplasmique, nucléaire, mitochondriale etc...) de la protéine comprenant ledit domaine. En particulier, la modification post-traductionnelle peut être une
20 modification d'une cystéine, dans le domaine CAAX carboxy-terminal de la protéine d'intérêt à l'aide d'enzymes de type farnésyl-transférase ou géranylgéranyl-transférase. CAAX signifie "Cystéine-Aacide aminé Aliphatique-Aacide aminé Aliphatique-Aacide
25 aminé X", où X peut être une méthionine, une glutamine, une sérine ou une thréonine. La modification post-traductionnelle peut être, à titre d'exemples non limitatifs, une farnésylation, une géranylgéranylation, une myristilation, ou une palmytoylation, ou toute
30 autre modification connue de l'homme du métier. Lorsqu'elle est munie de la séquence peptidique résultant de la modification post-traductionnelle, la protéine est adressée à la membrane.

L'utilisation de la farnésylation a déjà été envisagée dans des traitements anti-cancéreux afin de rendre inactives certaines protéines (petites protéines G etc.) impliquées dans des pathologies, mais elle n'a
5 jamais été utilisée dans le cadre d'une induction de l'expression d'un gène.

Le procédé de contrôle de l'induction de l'expression post-transcriptionnelle d'un gène selon l'invention comprend le contrôle externe permanent et
10 modulable de l'induction de l'expression du gène par modulation de l'état de modification post-traductionnelle de la protéine de fusion inductrice de l'expression post-transcriptionnelle du gène et plus particulièrement du domaine permettant une
15 délocalisation membranaire. Ce contrôle est mis en œuvre par l'utilisation d'un inhibiteur approprié de ladite modification post-traductionnelle. Si la modification post-traductionnelle de la protéine de fusion est une farnésylation, un inhibiteur approprié
20 est un inhibiteur de la farnésyl transférase, tel que FTI 277. Si la modification post-traductionnelle de la protéine de fusion est une géranylgéranylation, un inhibiteur approprié est un inhibiteur de la géranyl transférase, tel que GGTI 298. L'homme du métier saura
25 déterminer l'inhibiteur approprié compte tenu du domaine de modification post-traductionnelle présent.

En l'absence d'inhibiteur, la modification post-traductionnelle de la protéine de fusion inductrice aura lieu. La protéine de fusion, une fois synthétisée
30 et munie de la séquence peptidique induisant la modification post-traductionnelle, sera ancrée dans une membrane cellulaire, et ne pourra donc jouer son rôle d'activateur de l'expression du gène.

A l'inverse, en présence d'un inhibiteur approprié, la modification post-traductionnelle ne se produira pas, et la protéine de fusion inductrice ne sera plus adressée à la membrane et pourra donc jouer son rôle d'activateur de l'expression du gène.

L'invention a pour objet une protéine de fusion inductrice de l'expression d'un gène comprenant, d'une part, un domaine peptidique de liaison aux acides ribonucléiques et un domaine activateur de l'expression post-transcriptionnelle dudit gène, et, d'autre part, un domaine permettant une délocalisation à la membrane cytoplasmique.

A titre d'exemple de protéine de fusion inductrice selon l'invention, on citera les protéines de fusion R17-4G-CVLS où CVLS correspond à un domaine "CAAX" décrit comme responsable de la délocalisation de la protéine à la membrane.

L'invention a également pour objet un acide nucléique comprenant une séquence codant pour la protéine de fusion inductrice de l'expression selon l'invention. Cet acide nucléique peut être un ADN double brin ou monobrin, un ADNc, un ARN tel qu'un ARNm.

L'invention a également pour objet un vecteur d'expression, en particulier un plasmide, comprenant un acide nucléique selon l'invention.

L'invention a également pour objet une cellule recombinée comprenant un acide nucléique selon l'invention intégré dans son génôme, ainsi qu'une lignée cellulaire comprenant un tel acide nucléique. On citera à titre d'exemples non limitatifs les cellules d'hépatome humaines SKHep-1, les cellules HeLa ou les cellules CHO.

L'invention a également pour objet un organisme non humain transgénique, par exemple une souris, comprenant en tant que transgène un acide nucléique selon l'invention.

5 Plus précisément, selon l'invention, le procédé de contrôle externe, permanent et modulable de l'induction de l'expression post-transcriptionnelle d'un gène d'une cellule recombinée ou d'un organisme non humain transgénique comprenant un acide nucléique
10 comprenant une séquence codant pour une protéine de fusion inductrice selon l'invention, ou comprenant un vecteur comprenant ledit acide nucléique, implique la modulation de l'état de modification post-traductionnelle de la protéine de fusion induisant
15 l'expression du gène par l'utilisation d'un inhibiteur approprié de la modification post-traductionnelle de ladite protéine de fusion.

Le contrôle de l'induction de l'expression post-transcriptionnelle du gène est donc simple, modulable
20 et permanent : il est possible à tout moment de commencer, arrêter, reprendre l'addition de l'inhibiteur de la modification post-traductionnelle approprié, de modifier les quantités ajoutées, afin de contrôler l'induction aussi bien qualitativement que
25 quantitativement. Par ailleurs, compte tenu des taux d'induction élevés pouvant être obtenus, il est possible d'utiliser l'inhibiteur de la protéine de fusion à une concentration faible, en évitant ainsi éventuellement des problèmes de toxicité.

30 L'un des avantages de la présente invention est la possibilité de faire exprimer par une cellule un gène rapporteur et un gène effecteur, le gène rapporteur comprenant un site de liaison pour un

polypeptide et au moins un gène d'intérêt, et le gène effecteur codant pour une protéine de fusion inductrice selon l'invention comprenant au moins ledit polypeptide reconnu par le site de liaison.

5 L'invention a donc également pour objet une cellule, exprimant un gène rapporteur et un gène effecteur, le gène rapporteur comprenant un site de liaison pour un polypeptide et au moins un gène d'intérêt, et le gène effecteur codant pour une
10 protéine de fusion inductrice selon l'invention comprenant au moins ledit polypeptide reconnu par le site de liaison. L'expression de ces gènes dans la cellule peut se faire par transfection d'un plasmide rapporteur et d'un plasmide effecteur, ou tout autre
15 moyen connu de l'homme du métier.

De préférence, la cellule est une cellule eucaryote et le polypeptide est un polypeptide non-eucaryote, en particulier de bactériophage, et plus particulièrement la protéine de capsid du
20 bactériophage R17. Dans ce dernier cas, la protéine de fusion comprendra la protéine de capsid du bactériophage R17. L'intérêt est que le couple gène rapporteur/gène effecteur est alors totalement exogène par rapport au système eucaryote dans lequel il est
25 exprimé, ce qui évite le bruit de fond parfois important lié à l'induction non souhaitée de gènes endogènes.

Dans un mode de réalisation particulier, le gène rapporteur est exprimé à partir d'un ARN bicistronique, comprenant un premier cistron et un deuxième cistron.
30 L'espace intercistronique peut comprendre un site de liaison pour la protéine de fusion inductrice. Une telle structure bicistronique permet une grande

variabilité de gènes rapporteurs, multipliant ainsi les possibilités de sélection, localisation, marquage d'expression, etc.

De nombreuses applications de l'invention peuvent
5 être envisagées.

En particulier, l'invention présente un grand intérêt en thérapie génique. Il est possible de compléter le génôme défectueux d'un organisme avec un gène x dont l'expression sera contrôlée de façon
10 précise à l'aide de concentrations modulables de l'inhibiteur approprié. Il est également possible de faire exprimer en concentration variable et contrôlée un ou des gènes capables de tuer ou d'inhiber la prolifération des cellules de l'organisme (par exemple
15 gène codant pour la fraction soluble de récepteur membranaire, gène codant pour fragments scFv d'anticorps etc...). Il est aussi possible de contrôler l'expression et donc de faire exprimer en concentration variable des anti-oncogènes (par exemple p53, p70), des
20 cytokines ou interleukines, des facteurs de croissance, des dominants négatifs de certaines protéines, des xénogènes.

L'invention peut également être utilisée pour le criblage d'inhibiteurs de modification post-
25 traductionnelle. Ce criblage peut être effectué grâce à un kit de criblage : kit obtenu par intégration stable de plasmides selon l'invention dans des lignées cellulaires, ou kit obtenu par transfection provisoire ou « plasmides nus ». Un kit selon l'invention peut
30 également comprendre une cellule selon l'invention comprenant un gène rapporteur telle que décrite ci-dessus.

Un kit selon l'invention permet d'évaluer l'influence de la présence d'un agent donné sur la modification post-traductionnelle d'une protéine de fusion inductrice, et permet donc de déterminer si
5 ledit agent est ou non un inhibiteur. A titre d'exemples d'inhibiteurs criblés, on peut citer les inhibiteurs de prényl transférase antifarnésyl, les inhibiteurs de prényl transférase antigéranyl-géranyl, les inhibiteurs de palmitoylation, les inhibiteurs de
10 myristylation, etc.

L'invention peut également être utilisée en recherche fondamentale pour sélectionner l'expression de certains gènes dans des cellules en culture ou dans des tissus d'animaux de laboratoire (in vitro). On peut
15 générer l'induction et la modulation ponctuelle ou à long terme de l'expression de n'importe quelle protéine ; on peut obtenir une induction et une répression rapides de l'expression de protéine.

On pourra notamment utiliser des agents déjà
20 connus et en phase clinique pour d'autres applications (en particulier des inhibiteurs) et dont on sait qu'ils n'ont pas d'effets toxiques.

Exemple 1

25 Cet exemple a pour objet la mise en évidence du contrôle de l'induction de l'expression d'un gène dans des cellules mammifères en culture ex vivo.

Dans cet exemple, l'étape de l'expression qui est induite est la traduction, et la modification post-
30 traductionnelle de la protéine de fusion inductrice est une farnésylation.

On utilisera des plasmides de deux types :

1. des plasmides "reporteurs" permettant de transcrire dans les cellules un ARN bicistronique codant pour les protéines reportrices LucR (Luciférase renilla) en premier cistron et LucF (Luciférase firefly) en deuxième cistron. Les plasmides pCRL30-R17 ou pCRL138-R17 contiennent en outre dans l'espace intercistronique de l'ARNm un site de liaison pour la protéine de capsid du bactériophage R17 (plasmide). Les plasmides pCRL30 ou pCRL138 (contrôle) ne contiennent pas ce site.

2. des plasmides effecteurs qui vont pouvoir exprimer dans les cellules :

- une protéine de fusion entre la protéine de capsid de phage R17 et la région C-terminale du facteur d'initiation de la traduction eIF4G, pour le plasmide pCI R17-4G,
- une protéine de fusion entre la protéine de capsid de phage R17, la région C-terminale du facteur d'initiation de la traduction eIF4G et un domaine protéique de farnésylation (de séquence protéique CVLS), pour le plasmide pCI R17-4G-CVLS.

On procède de la façon suivante. Des cellules d'hépatome humaines SKHep-1 sont transfectées transitoirement à l'aide de liposomes cationiques en utilisant 10 pmoles de plasmides reporteurs et 5 pmoles de plasmides activateurs pour 1 million de cellules. 24 heures après la transfection, les cellules sont traitées durant différentes périodes (1 à 8 heures) par un inhibiteur de farnésyl transférase, le Cys-Val-3(2-

Naphthyl)Ala-Met ; Sigma C4433, à une concentration finale de 15 μ M dans le milieu de culture.

Après lyse des cellules, les activités LucR et LucF sont dosées à l'aide du kit « Dual-Luciferase (TM) Reporter System » (Promega E1980) sur un appareil à luminescence de type Berthold LB96B. Le rapport LucF/LucR représente l'activité de traduction du deuxième cistron qui est sous contrôle du système d'inductibilité.

Les graphes de la figure 1 représentent l'évolution du rapport LucF/LucR en fonction du temps de traitement pour les deux types de plasmide reporteur pCRL30 et pCRL30-R17. Le graphe a montre l'évolution du rapport en absence de plasmide effecteur. Le graphe b montre l'évolution du rapport en présence de plasmide exprimant la protéine de fusion R17-4G. Le graphe c montre l'évolution du rapport en présence de plasmide exprimant la protéine de fusion inductrice R17-4G-CVLS.

On peut observer que le rapport est faible dans le cas où les plasmides reporteurs sont transfectés en l'absence de plasmides effecteurs. La traduction du deuxième cistron est donc faible dans ce cas (graphe a). L'expression de la protéine de fusion R17-4G permet une augmentation du niveau de traduction du deuxième cistron de l'ARN bicistronique reporteur contenant le site R17 (pCRL 30R17), mais pas de celui ne contenant pas le site R17 (pCRL 30) (graphe b). On peut observer enfin (graphe c) que le niveau de traduction induite par l'expression de la protéine de fusion R17-4G n'est pas modulé par le traitement avec l'inhibiteur de farnésyl transférase. Au contraire, l'augmentation de traduction induite par la protéine de fusion inductrice R17-4G-CAAX est modulée par l'utilisation de

l'inhibiteur de farnésyl transférase, et plus particulièrement est dépendante du temps de traitement par l'inhibiteur de farnésyl transférase.

5 Exemple 2

Les travaux réalisés sur les SKHep peuvent être étendus à d'autres lignées cellulaires et notamment les cellules HeLa (issue d'un adénocarcinome utérin).

10 Cette lignée HeLa a été utilisée pour réaliser des intégrations permanentes de plasmides effecteurs exprimant la protéine de fusion R17-4G-CVLS ou de plasmides "reporteurs" contenant (pCRL30-R17 ou pCRL138-R17) ou non (pCRL30 ou pCRL138) la structure ARN reconnue par la protéine R17. Ces transfections
15 permanentes associées à un gène de résistance au G418 ont permis la sélection de clones cellulaires. Parmi les clones obtenus, ceux qui permettaient d'avoir le meilleur signal d'activation par rapport au bruit de fond ont été sélectionnés.

20 Deux types d'études ont été réalisés en fonction du clone stable utilisé.

Première étude.

25 a) Confirmation de l'effet de l'inhibiteur de farnésyl transférase FTI 277.

L'acide nucléique codant pour la protéine R17-4G-CVLS est intégré dans le génome de cellules HeLa. On réalise des transfections transitoires des plasmides
30 reporteurs pCRL138 et pCRL138-R17 dans ce clone. On recherche ensuite les produits agissant sur la farnésylation de R17-4G-CVLS.

La figure 2A confirme l'effet de l'inhibiteur de farnésyl transférase FTI 277.

Le DMSO est le solvant dans lequel sont dissous les produits (FTI 277 et GGTI 298) ajoutés dans le milieu de culture, et représente donc un contrôle de l'induction. La concentration finale en DMSO dans le milieu de culture ne dépasse pas 0,1%.

Les rectangles blancs représentent l'ARN qui porte la séquence de reconnaissance de la protéine R17. Les rectangles noirs représentent les activités obtenues dans les mêmes conditions avec une séquence d'ARN semblable mais ne portant plus la reconnaissance R17, il s'agit donc du témoin négatif de la première construction.

L'induction est représentée par le quotient des valeurs LucF et LucR mesurées directement en présence d'un agent (FTI 277 ou GGTI 298), par rapport au contrôle DMSO.

Ainsi, la cinétique d'action de FTI 277 représentée en figure 2A montre que FTI 277 a un effet inducteur, et que l'effet d'activation maximal est obtenu à 8 heures de traitement. Il faut également noter que le traitement des cellules par un inhibiteur de géranylgéranyl transférase, le GGTI 298, n'a pas d'effet d'activation, ce qui démontre la spécificité du mécanisme.

La figure 2B montre que l'effet d'activation du FTI 277 est réversible. Dans cette expérience, on a traité les cellules pendant 8 h avec du FTI 277 1 μ M puis on a enlevé le produit et on a observé une diminution rapide du rapport d'activation LucF/LucR aux différents temps indiqués.

b) Confirmation de l'effet de l'inhibiteur de l'HMGCoA-réductase et criblage d'inhibiteurs

L'HMGCoA-réductase, qui synthétise le mévalonate, est impliquée dans l'isoprénylation, une modification post-traductionnelle des protéines telles que 4G-CVLS.

Cette enzyme est inhibée par les statines (lovastatine, simvastatine etc...).

Dans la figure 3, les cellules utilisées au cours de ces essais sont des HeLa transfectées de manière stable par le plasmide codant pour la protéine de fusion R17-4G-CVLS, et transfectées transitoirement par les plasmides reporteurs bicistroniques *pCRL138* et *pCRL138-R17*.

Les résultats sont présentés sous forme de rapport d'activité LucF/LucR en présence de différents agents pharmacologiques dans le milieu de culture, par rapport à un témoin DMSO.

On voit en pistes 3 et 6 de la figure 3 que la présence de statine inhibe l'HMGCoA-réductase, donc la présylation, la protéine de fusion n'est donc pas adressée à la membrane et joue son rôle d'activateur.

On voit en pistes 2, 4 et 5 que la présence de mévalonate, synthétisé par l'HMGCoA-réductase, permet, même en présence d'un inhibiteur de l'HMGCoA-réductase, l'isoprénylation c'est-à-dire la modification post-traductionnelle de la protéine de fusion qui sera donc adressée à la membrane et qui ne pourra jouer un rôle d'activateur d'où des rapports LucF/LucR identiques ou très proches de celui du témoin.

Le modèle utilisé a également permis de cribler des agents inhibiteurs potentiels de l'HMGCoA-réductase.

On voit en pistes 7 et 8 que le tamoxifène, un anti-œstrogène, inhibe cette enzyme même à de faibles concentrations. Cette activité inhibitrice est indépendante de l'œstradiol et du récepteur des oestrogènes (absent dans les cellules HeLa utilisées) et est inversée ou compensée par le mévalonate (piste 9).

D'autres anti-oestrogènes ont été testés.

En pistes 13, 14 et 15 sont représentés les résultats obtenus avec des anti-oestrogènes stéroïdiens des sociétés ICI et Roussel Uclaf, ayant une forte affinité pour le récepteur des oestrogènes, à différentes concentrations. Ces anti-oestrogènes n'ont pas d'activité inhibitrice de l'HMGCoA-réductase.

Par contre un autre anti-œstrogène, appelé PBPE, conçu et fabriqué par les inventeurs, ne se liant pas au récepteur des oestrogènes mais se liant à un complexe protéique dit AEBS (« antiestrogen binding site ») s'est révélé être inhibiteur de l'HMGCoA-réductase (pistes 10 et 11), son activité inhibitrice étant, comme pour les inhibiteurs précédents, compensée par la présence de mévalonate.

c) Molécules inhibitrices de la farnésyl pyrophosphate-synthase également appelée FPP-synthase.

Cette enzyme est nécessaire à la biosynthèse des farnésylpyrophosphates. Son inhibition inhibe donc également la prénylation des protéines.

Dans ces essais représentés dans la figure 4, le même modèle cellulaire qu'en b), transfecté de manière stable avec R17-4G-CVLS, est utilisé.

Les résultats des pistes 2 à 6 et 9 montrent que les biphosphonates, habituellement utilisés comme

antalgiques dans le traitement des métastases osseuses, sont également des inhibiteurs de la farnésylation et que leur présence augmente donc le rapport LucF/LucR.

Les résultats des pistes 7 et 8 montrent que la
5 présence de mévalonate ne compense pas l'activité inhibitrice des biphosphonates. Au contraire, la présence de farnésol (pistes 11 et 12) inverse ou compense l'activité inhibitrice des biphosphonates, ce qui montre que cette activité n'est pas liée à
10 l'inhibition de la l'HMGCoA-réductase, mais qu'ils agissent en aval dans la cascade de biosynthèse des isoprènes et sans doute au niveau de la FPP-synthase.

Les résultats obtenus en présence de tamoxifène (pistes 12 à 16) montrent que le tamoxifène est
15 également un inhibiteur de la FPP-synthase.

Ce modèle a donc permis de montrer que certaines molécules inhibent de façon inattendue la biosynthèse des isoprényles en agissent sur la prénylation
20 protéique. Il a mis en évidence que deux familles de médicaments (antiestrogènes et biphosphonates) parmi les plus utilisés en cancérothérapie du fait de leur grande innocuité, sont également capables d'inhiber la farnésylation.

25

Deuxième étude.

Les séquences reportrices pCRL138 ou pCRL138-R17 sont intégrées dans le génome des cellules HeLa, et différentes constructions R17-4G-CAAX - où CAAX peut
30 être farnésylé "CVLS", ou géranylgéranylé "CVLL", ou ne pouvant plus subir de modifications post-traductionnelles de ce type "SVLS" - sont transfectées de manière transitoire dans ces deux clones.

Après transfection, les cellules sont traitées par du FTI 277 (inhibiteur de farnésyl transférase) ou du GGTI 298 (inhibiteur de géranyl transférase).

On observe les résultats suivants, représentés en figure 5, par rapport aux témoins DMSO :

- pour R17-4G-CVLS (qui contient une boîte de farnésylation), seul le FTI 277 est capable d'activer la traduction,
- pour R17-4G-CVLL (qui contient une boîte de géranylation), seul le GGTI 298 est capable d'activer la traduction,
- pour R17-4G-SVLS (qui ne peut être ni farnésylé, ni géranylé), aucune des deux molécules n'est capable d'activation.

Cette expérience montre donc une très bonne spécificité d'action des inhibiteurs, ce qui permet un contrôle précis de l'induction.

Par ailleurs, la localisation subcellulaire de protéines contenant les boîtes CVLS, CVLL ou SVLS a été contrôlée.

Pour ce faire, ces boîtes ont été mises en fusion avec la protéine YFP (« yellow Fluorescent protein »), et toutes les protéines de fusion ont été clonées avec une séquence HA en N-terminal. Les constructions ont été transfectées de façon transitoire dans des cellules HeLa, et la localisation des protéines de fusion a été suivie en microscopie à fluorescence après immunofluorescence avec un anticorps anti-HA (Fig. 6A et B, en couleur).

On remarque que les protéines de fusion contenant des boîtes CVLS ou CVLL sont à localisation membranaire prédominante.

On peut également noter que le traitement par le FTI 277 (8 heures) relocalise uniquement les protéines YFP-CVLS et R17-4G-CVLS vers le cytoplasme, ce qui n'est pas le cas du traitement par le GGTI 298.

5

Exemple 3

Le plasmide rapporteur construit dans le cadre de cet exemple permet de transcrire dans des cellules mammifères en culture ex vivo un ARN bicistronique
10 codant pour une protéine tronquée H2-Kk (« mouse MHC class I molecule ») comme marqueur de sélection des cellules transfectées et pour la protéine p27Kip1 qui est une protéine inhibitrice du cycle cellulaire. L'ARN bicistronique contient également dans l'espace
15 intercistronique un site de liaison pour la protéine de capsid du bactériophage R17. Cet ARN bicistronique est très schématiquement représenté en Figure 7.

Le plasmide effecteur utilisé est celui permettant d'exprimer la protéine de fusion R17-4G-CVLS.

20 Des cellules CHO (« Chinese Hamster Ovaries ») sont transfectées transitoirement à l'aide de liposomes cationiques en utilisant 10 pmoles de plasmides reporteur et 5 pmoles de plasmides activateur pour 1 million de cellules. Douze heures après la
25 transfection, les cellules sont traitées pendant 8 heures par l'inhibiteur de farnésyl transférase (Cys-Val-3(2-Naphthyl)Ala-Met ; Sigma C4433) à une concentration finale de 1 μ M dans le milieu de culture. La sélection des cellules transfectées se fait avec le
30 kit « MACSelect™ Kk » (Milteny Biotech). Après lyse des cellules sélectionnées, les extraits protéiques sont déposés sur gel SDS-PAGE.

Les résultats sont présentés sur la figure 7. L'expression de la protéine p27 (ligne α p27) est examinée par western-blot avec un anticorps monoclonal (Ref. 610241, BD Bioscience Pharmingen). L'expression
5 de la protéine de fusion R17-4G-CVLS (ligne α HA) est détectée par western-blot en utilisant un anticorps monoclonal contre le peptide HA (Eurogentec) localisé à l'extrémité NH2-terminale de la protéine R17-4G-CVLS.

La colonne "Mock" est la colonne contrôle, qui
10 représente l'expression de la protéine p27 et de la protéine de fusion dans des cellules non-transfectées par les plasmides rapporteur et effecteur. La colonne R17-4G-CVLS représente l'expression de la protéine p27 et de la protéine de fusion dans les cellules co-
15 transfectées en absence d'inhibiteur. La colonne R17-4G-CVLS + FTI277 représente l'expression de la protéine p27 et de la protéine de fusion dans les cellules co-transfectées après le traitement avec l'inhibiteur.

On observe une augmentation de la quantité de p27
20 dans les cellules cotransfectées avec les vecteurs pR17-4G-CVLS et pK-R17-p27 en présence d'inhibiteur de farnésyl transférase. Cette augmentation est indépendante de la quantité de protéine de fusion produite, identique avec ou sans traitement avec
25 l'inhibiteur. Par contre, en présence de l'inhibiteur, la protéine de fusion n'est pas adressée à la membrane et peut jouer son rôle d'activateur, d'où l'augmentation de la quantité de p27.

REVENDICATIONS

1. Protéine de fusion inductrice de l'expression
5 d'un gène caractérisé en ce qu'elle comprend, d'une
part, un domaine peptidique de liaison aux acides
ribonucléiques et un domaine activateur de l'expression
post-transcriptionnelle du gène, et, d'autre part, un
domaine permettant une délocalisation à la membrane
10 cytoplasmique.

2. Protéine de fusion selon la revendication 1,
caractérisée en ce que le domaine activateur de
l'expression est un domaine activateur de la
traduction.

15 3. Protéine de fusion selon l'une ou l'autre des
revendications 1 et 2, caractérisée en ce que le
domaine permettant une délocalisation à la membrane
cytoplasmique est un domaine de farnésylation.

4. Acide nucléique comprenant une séquence codant
20 pour une protéine selon l'une quelconque des
revendications 1 à 3.

5. Vecteur d'expression comprenant un acide
nucléique selon la revendication 4.

6. Cellule recombinée comprenant un acide
25 nucléique selon la revendication 4 ou un vecteur
d'expression selon la revendication 5.

7. Lignée cellulaire de cellules recombinées
comportant un acide nucléique selon la revendication 4

ou un vecteur d'expression selon la revendication 5, notamment lignées cellulaires SKHep et HeLa.

8. Cellule exprimant un gène rapporteur et un gène effecteur, le gène rapporteur comprenant un site
5 de liaison pour un polypeptide et au moins un gène d'intérêt, et le gène effecteur codant pour une protéine de fusion inductrice selon l'une quelconque des revendications 1 à 3 comprenant au moins ledit polypeptide reconnu par le site de liaison.

10 9. Cellule selon la revendication 8, dans laquelle la cellule est eucaryote et le polypeptide est non-eucaryote.

10. Cellule selon l'une ou l'autre des revendications 8 et 9, dans laquelle le gène rapporteur
15 est exprimé à partir d'un ARN bicistronique, comprenant un premier cistron et un deuxième cistron.

11. Organisme non humain transgénique comprenant un acide nucléique selon la revendication 4 ou un plasmide selon la revendication 5.

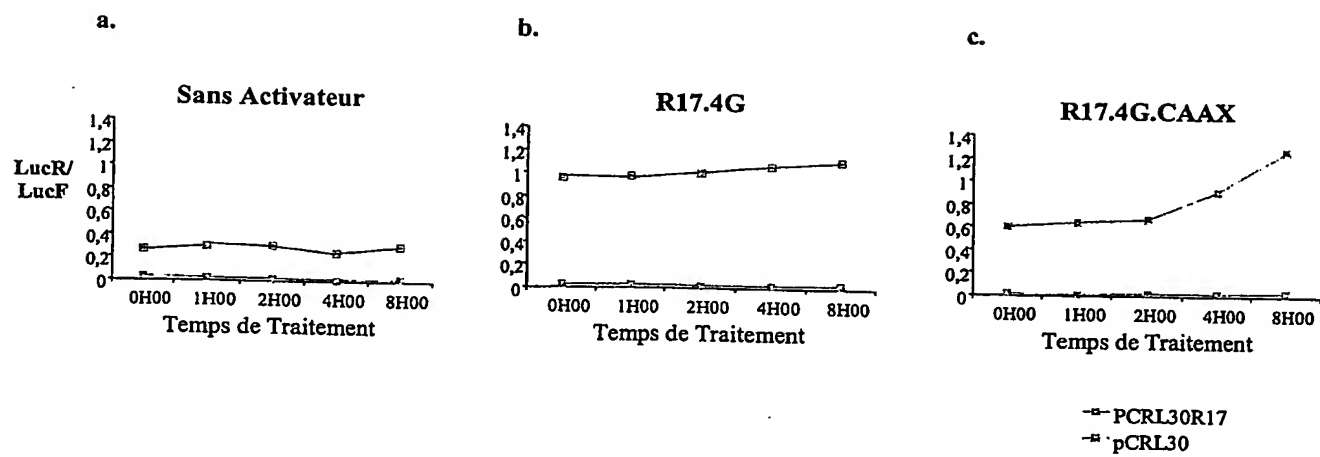
20 12. Procédé in vitro de contrôle externe, permanent et modulable de l'induction de l'expression post-transcriptionnelle d'un gène d'une cellule recombinée ou d'un tissu non humain transgénique comprenant un acide nucléique comprenant une séquence
25 codant pour une protéine de fusion selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, ou comprenant un vecteur d'expression comprenant ledit acide nucléique, par modulation de l'état de modification post-traductionnelle de la protéine de fusion par

l'utilisation d'un inhibiteur approprié de ladite modification post-traductionnelle.

13. Kit de criblage d'agents comprenant au moins une cellule selon l'une quelconque des
5 revendications 6 à 10.

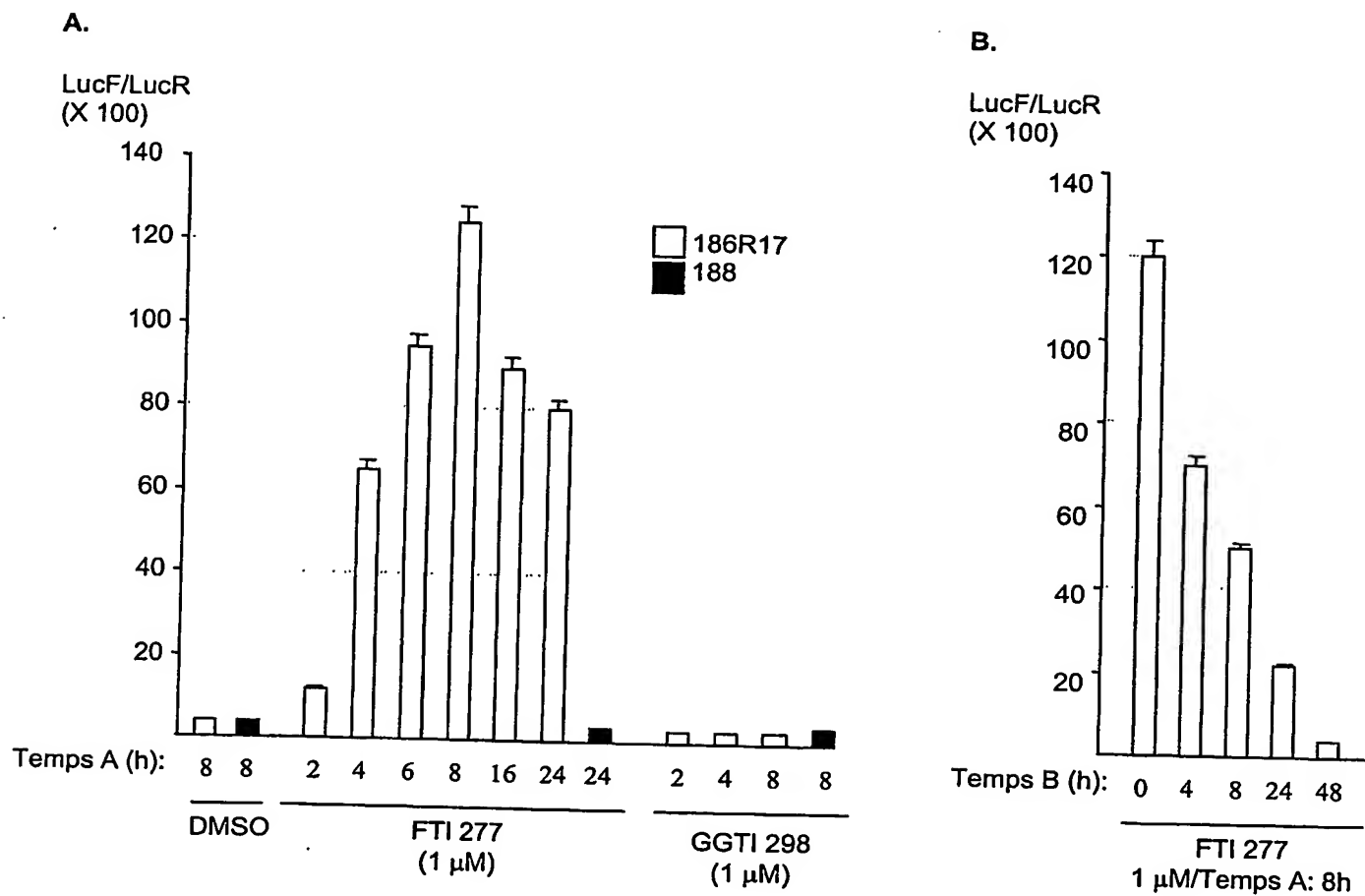
1/7

FIGURE 1



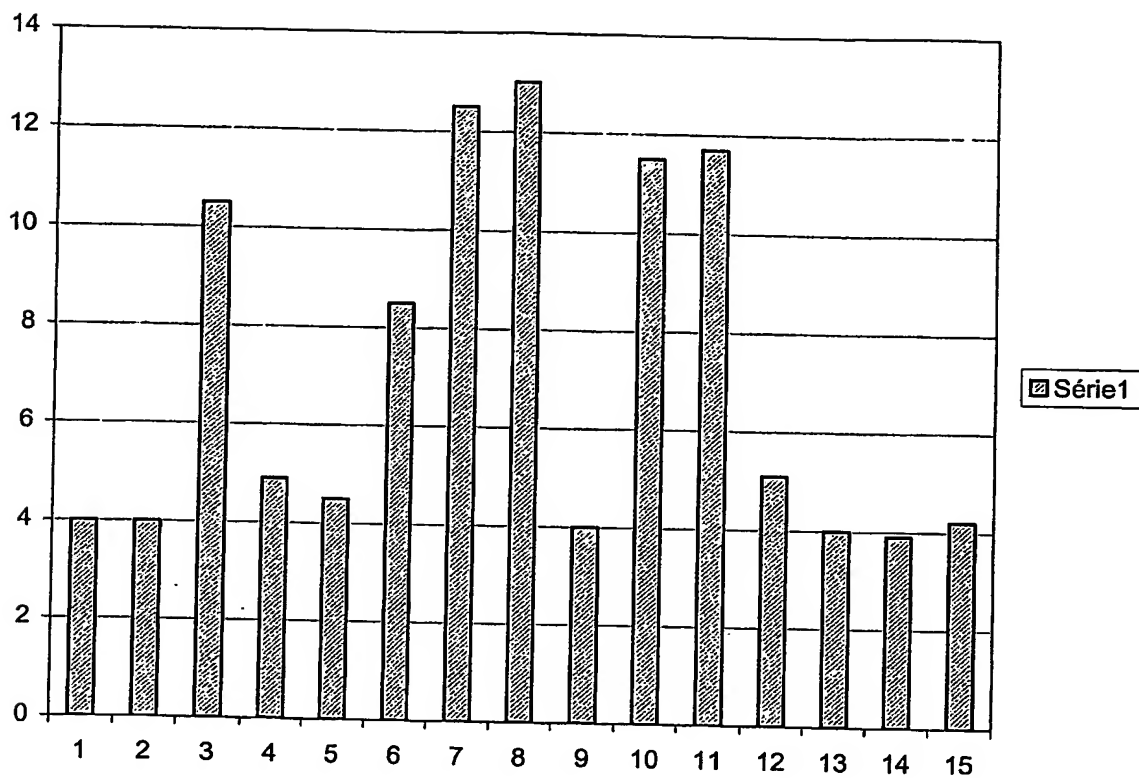
2/7

FIGURE 2



3/7

FIGURE 3

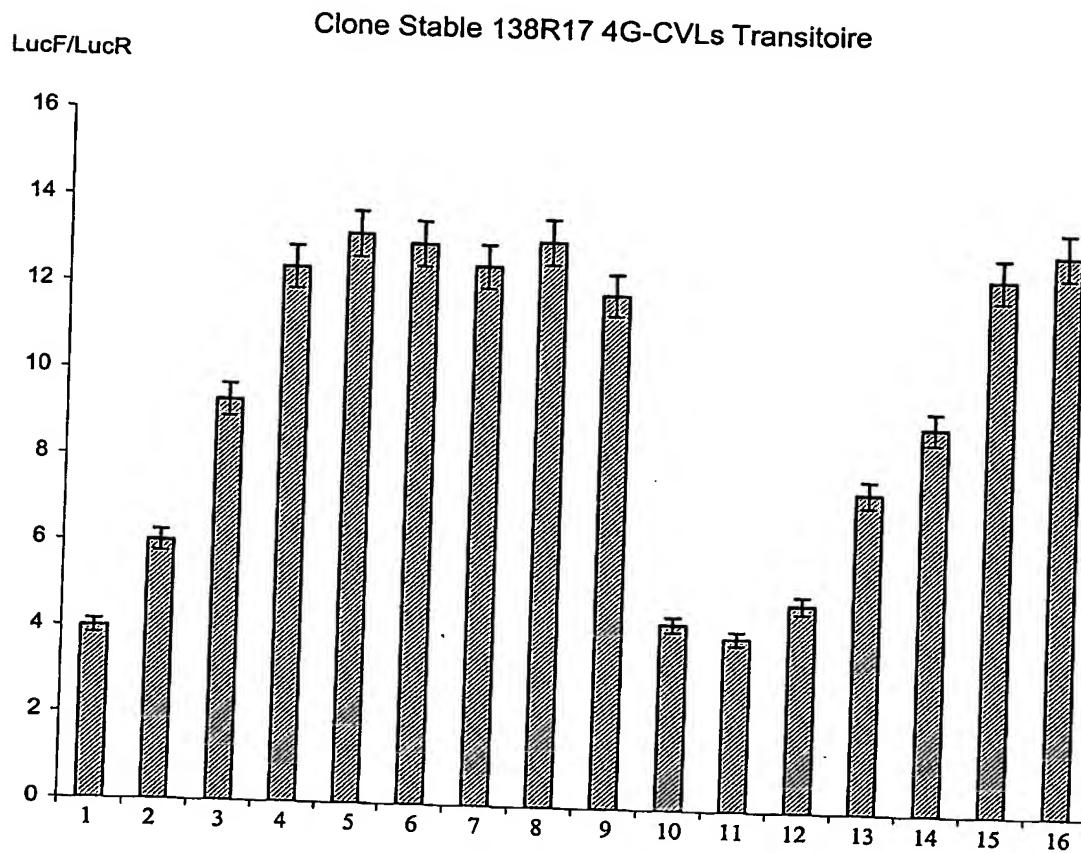


- 1 témoin
- 2 mev 1mM
- 3 stat 20µM
- 4 stat 20µM +mev 1mM
- 5 stat 5µM+mev 1mM
- 6 statine 5µM
- 7 tam 0,5µM
- 8 tam 0,5µM + œstradiol 100 nM
- 9 tamoxifène 0,5µM +mev 1mM
- 10 PBPE 5µM
- 11 PBPE 5µM +œstradiol 100nM
- 12 PBPE 5µM + mev 1mM
- 13 anti-stéroïdien 1µM
- 14 anti-stéroïdien 10µM
- 15 anti-stéroïdien 50µM

mev = mévalonate
stat = statine
tam = tamoxifène

4/7

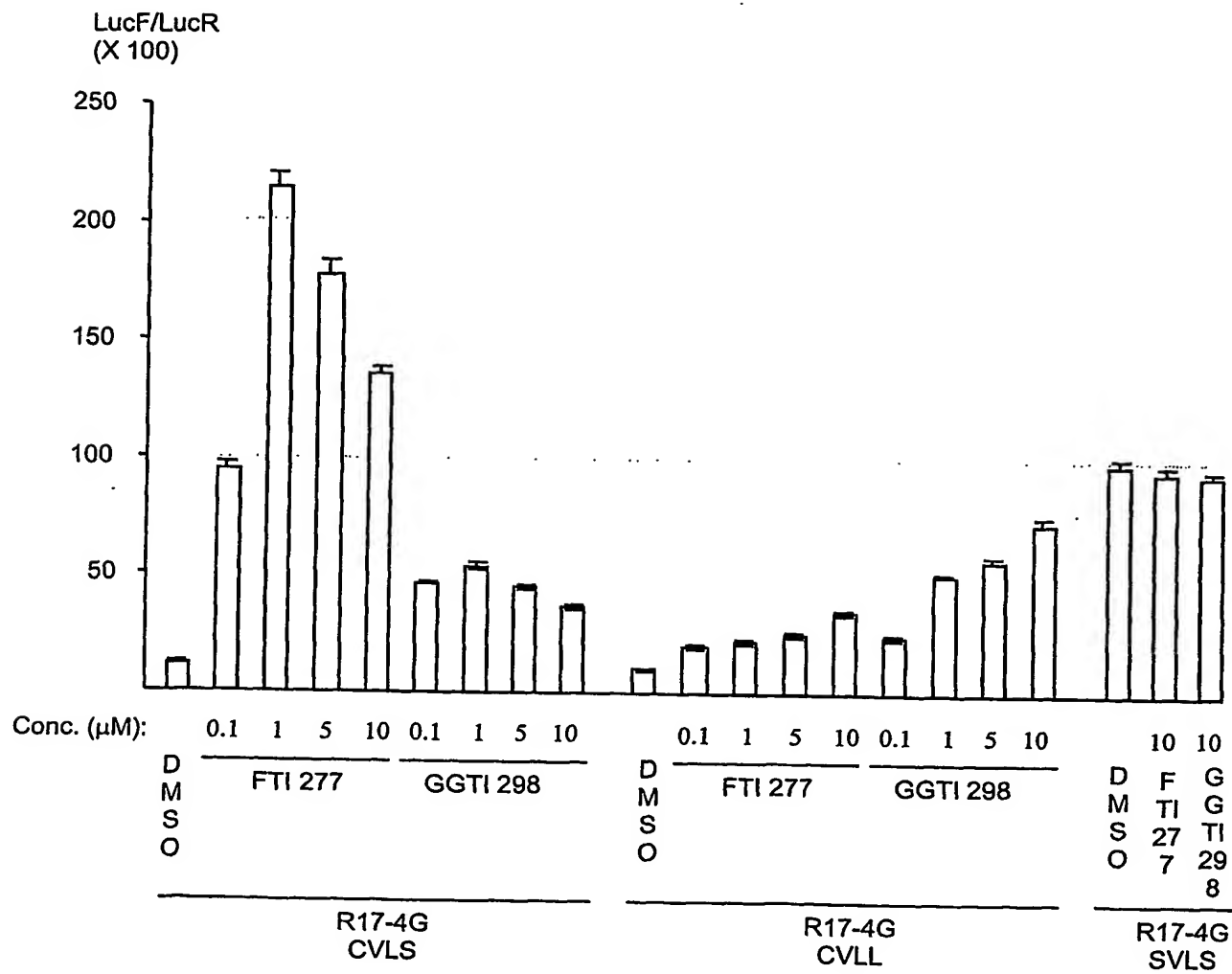
FIGURE 4



Histogramme de l'activité (dose réponse) d'un biposphonate et du tamoxifène

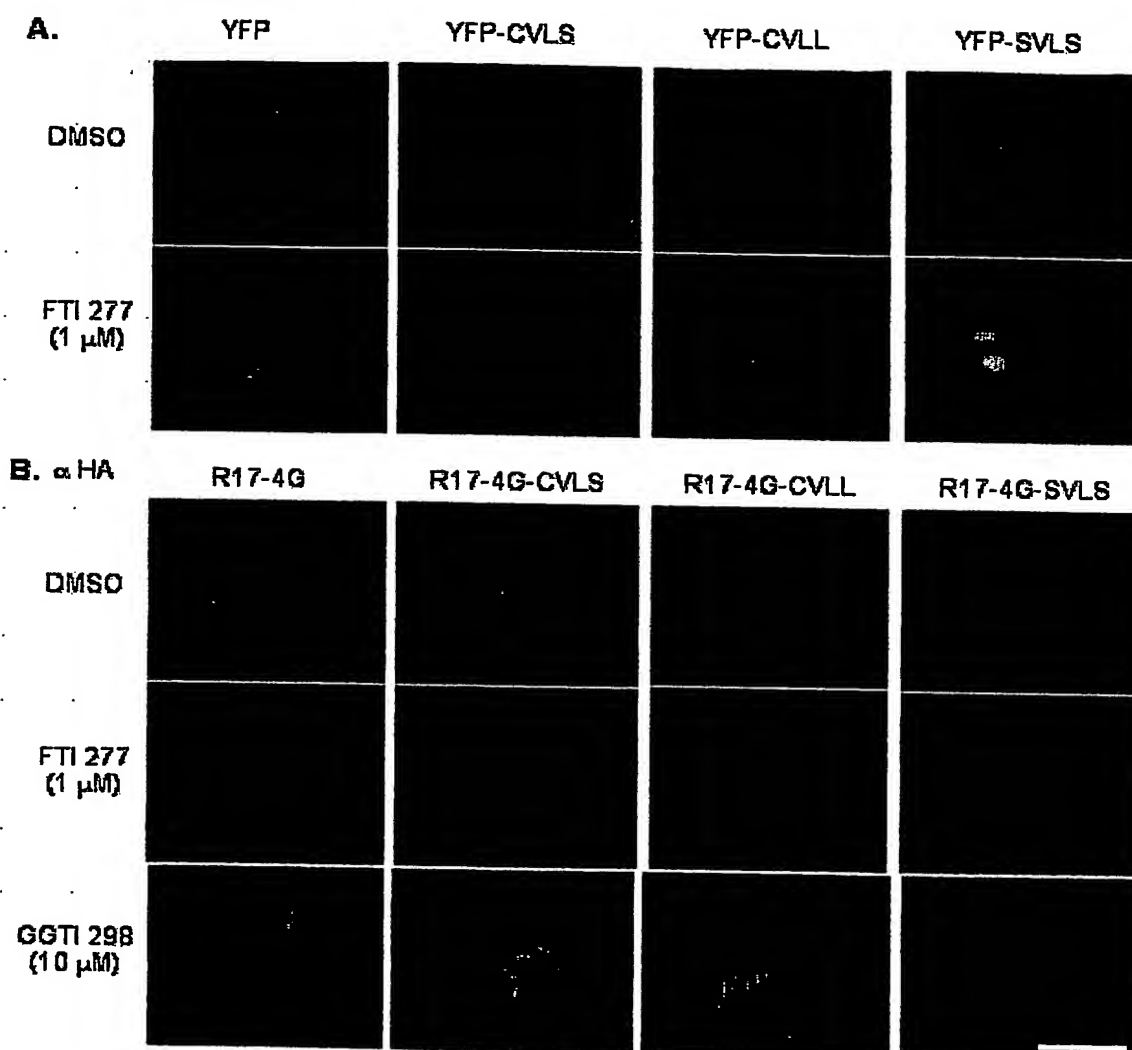
- 1 Clone témoin avec 4G-CVLS transitoire
- 2 + biposphonate 0,1 μ M
- 3 + biposphonate 0,5 μ M
- 4 + biposphonate 1 μ M
- 5 + biposphonate 5 μ M
- 6 + biposphonate 10 μ M
- 7 + biposphonate 1 μ M + mévalonate (mévalolactone) 50 μ M
- 8 + biposphonate 1 μ M + mévalonate (mévalolactone) 250 μ M
- 9 + biposphonate 5 μ M
- 10 + biposphonate 1 μ M + farnésol 5 μ M
- 11 + biposphonate 1 μ M + farnésol 10 μ M
- 12 + tamoxifène 0,01 μ M
- 13 + tamoxifène 0,05 μ M
- 14 + tamoxifène 0,1 μ M
- 15 + tamoxifène 0,5 μ M
- 16 + tamoxifène 1 μ M

FIGURE 5



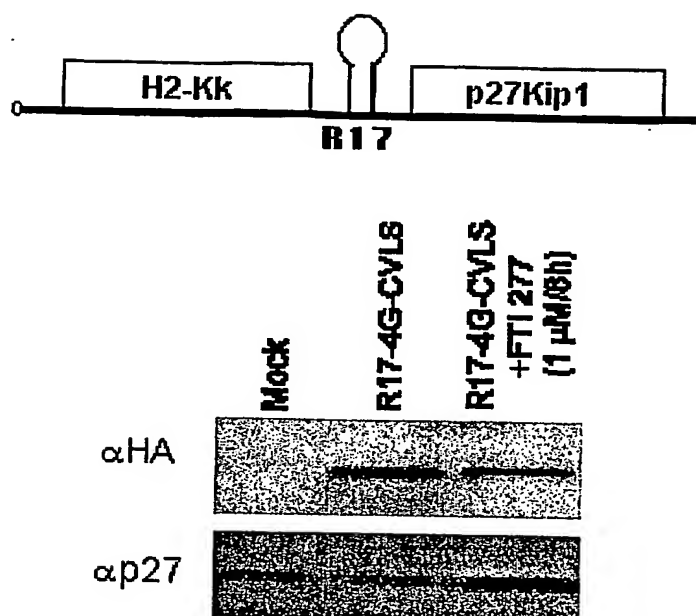
6/7

FIGURE 6



7/7

FIGURE 7



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/FR2004/000073

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C12N15/62

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 00/53779 A (EUROP MOLECULAR BIOLOGY LAB ;GREGORIO ENNIO DE (DE); HENTZE MATTHI) 14 September 2000 (2000-09-14) cited in the application the whole document	1-13
A	GB 2 273 708 A (ZENECA LTD) 29 June 1994 (1994-06-29) cited in the application the whole document	1-13
A	WO 99/11801 A (BROAD PETER MICHAEL ;HOLLIS MELVYN (GB); ZENECA LTD (GB); CHARLES) 11 March 1999 (1999-03-11) cited in the application the whole document	1-13

	---/---	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- *&* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

1 June 2004

Date of mailing of the international search report

02/07/2004

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Schwachtgen, J-L

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR2004/000073

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>MOSSER D D ET AL: "USE OF A DICISTRONIC EXPRESSION CASSETTE ENCODING THE GREEN FLUORESCENT PROTEIN FOR THE SCREENING AND SELECTION OF CELLS EXPRESSING INDUCIBLE GENE PRODUCTS" BIOTECHNIQUES, EATON PUBLISHING, NATICK, US, vol. 22, no. 1, January 1997 (1997-01), pages 150-152,154,156,158-161, XP000919498 ISSN: 0736-6205 the whole document</p>	9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR2004/000073

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0053779	A	14-09-2000	US 6610508 B1 AU 3032699 A CA 2366063 A1 WO 0053779 A1 EP 1159433 A1	26-08-2003 28-09-2000 14-09-2000 14-09-2000 05-12-2001
GB 2273708	A	29-06-1994	AU 5657794 A EP 0673428 A1 WO 9413818 A1 JP 8504331 T US 5776675 A	04-07-1994 27-09-1995 23-06-1994 14-05-1996 07-07-1998
WO 9911801	A	11-03-1999	EP 1009835 A2 WO 9911801 A2	21-06-2000 11-03-1999

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dem. de Internationale No

PCT/FR2004/000073

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 7 C12N15/62

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
CIB 7 C12N

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)
EPO-Internal

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	WO 00/53779 A (EUROP MOLECULAR BIOLOGY LAB ;GREGORIO ENNIO DE (DE); HENTZE MATTHI) 14 septembre 2000 (2000-09-14) cité dans la demande le document en entier	1-13
A	GB 2 273 708 A (ZENECA LTD) 29 juin 1994 (1994-06-29) cité dans la demande le document en entier	1-13
A	WO 99/11801 A (BROAD PETER MICHAEL ;HOLLIS MELVYN (GB); ZENECA LTD (GB); CHARLES) 11 mars 1999 (1999-03-11) cité dans la demande le document en entier	1-13
	-/--	



Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents



Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- *T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- *X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- *Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- *&* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

1 juin 2004

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

02/07/2004

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Schwachtgen, J-L

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No

PCT/FR2004/000073

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>MOSSER D D ET AL: "USE OF A DICISTRONIC EXPRESSION CASSETTE ENCODING THE GREEN FLUORESCENT PROTEIN FOR THE SCREENING AND SELECTION OF CELLS EXPRESSING INDUCIBLE GENE PRODUCTS" BIOTECHNIQUES, EATON PUBLISHING, NATICK, US, vol. 22, no. 1, janvier 1997 (1997-01), pages 150-152,154,156,158-161, XP000919498 ISSN: 0736-6205 le document en entier -----</p>	9

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

De  de Internationale No.

PCT/FR2004/000073

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)		Date de publication
WO 0053779	A	14-09-2000	US	6610508 B1	26-08-2003
			AU	3032699 A	28-09-2000
			CA	2366063 A1	14-09-2000
			WO	0053779 A1	14-09-2000
			EP	1159433 A1	05-12-2001
GB 2273708	A	29-06-1994	AU	5657794 A	04-07-1994
			EP	0673428 A1	27-09-1995
			WO	9413818 A1	23-06-1994
			JP	8504331 T	14-05-1996
			US	5776675 A	07-07-1998
WO 9911801	A	11-03-1999	EP	1009835 A2	21-06-2000
			WO	9911801 A2	11-03-1999